

中华绒螯蟹对体内细菌的清除作用

陆宏达, 刘凯

(上海水产大学 生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要: 采用颜料法确定中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 循环血体积 (V) 与体质量 (W) 间的回归曲线方程为 $V = 0.1576W - 0.898$ ($R_s = 0.83$, $P < 0.01$), 循环血体积与体质量的百分比 (V/W) 为 $(14.86 \pm 2.95)\%$ 。在确定中华绒螯蟹循环血体积的基础上, 通过注射革兰氏阳性蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 和革兰氏阴性大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 探讨进入中华绒螯蟹体内细菌随时间变化的清除规律以及通过组织学观察探讨细菌的清除方式。结果表明, 中华绒螯蟹对两种细菌的清除作用相似, 在注射菌后 60 min 时对蜡状芽孢杆菌和大肠杆菌的细菌清除率都达到最高, 分别为 $(88.57 \pm 4.84)\%$ 和 $(90.15 \pm 3.88)\%$; 120 min 时对两种细菌清除率与 60 min 时无显著性差异 ($P > 0.05$)。中华绒螯蟹的鳃和心脏中血细胞都可聚集而形成血细胞团, 并具有对细菌的包裹和吞噬作用, 血细胞团的形成以及包裹和吞噬作用是中华绒螯蟹清除细菌的重要途径。[中国水产科学, 2008, 15(1): 113-121]

关键词: 中华绒螯蟹; 细菌清除率; 包裹; 吞噬

中图分类号: Q955

文献标识号: A

文章编号: 1005-8737-(2008)01-0113-09

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 是中国特有的淡水养殖甲壳动物, 随着其养殖过程中病害问题的日益突出^[1-3], 通过免疫学方法进行疾病防治逐渐成为水产养殖业疾病防控的发展方向, 并得到了极大的关注, 但目前有关中华绒螯蟹基础免疫学和应用方面的研究还远落后于生产发展的需求, 阻碍了免疫学方法在其疾病防治上的应用。已有报道中华绒螯蟹具有酚氧化酶^[4]、溶菌酶、抗菌活性物质^[5-7]、凝集素^[8]以及血细胞在体外具有吞噬能力^[9]等免疫机制。但是这些研究工作都在体外进行, 难以正确反映病原生物侵入机体后中华绒螯蟹的实际免疫防御能力和状况。本研究通过注射法使细菌侵入中华绒螯蟹体内, 探讨中华绒螯蟹对细菌清除能力、清除方式和清除规律, 旨在为今后开展中华绒螯蟹疾病的免疫防治提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 中华绒螯蟹购于上海市水产市场, 体质量 38~75 g, 饲养于实验室水族箱中, 每日投饵 1 次, 24 h 充气, 及时换水保持水体洁净。

1.1.2 实验菌 革兰氏阳性实验菌: 蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*); 革兰氏阴性实验菌: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*)。以上 2 种实验菌均由上海水产大学微生物实验室提供。

1.2 中华绒螯蟹循环血体积的确定

为了计算通过注射进入中华绒螯蟹体内细菌总数随时间变化的清除规律, 首先需确定实验蟹的循环血体积。循环血体积的确定参照 Yeager 等^[10]的苋菜红染料 (Amaranth, $C_{20}H_{11}N_2O_{10}S_3Na_3$) 法。实验操作前用纱布将蟹体表擦干, 在注射和采血部位均用 70% 酒精棉球进行消毒。

1.2.1 苋菜红与 OD 值的关系标准曲线和回归方程

将含有抗凝剂^[11] (0.28 mol/L NaCl, 0.2 mol/L 葡萄糖, 0.06 mol/L 柠檬酸三钠, 0.052 mol/L 柠檬酸, 0.02 mol/L EDTA Na_2) 的无菌注射器插入中华绒螯蟹的第 3 步足基部软膜内 5~10 mm 处, 按抗凝剂与血淋巴体积比 2:5 抽取血淋巴混匀, 然后将 5 只蟹的抗凝血淋巴合并混匀, 放入塑料管中备用。取 0.5 mL 的抗凝血淋巴, 加入 1.0% 苋菜红和生理盐水, 配成苋菜红终质量分数分别为 0.000 25%、0.000 50%、0.000 75%、0.001 00%、0.001 25%、0.001 50%、

收稿日期: 2007-05-08; 修订日期: 2007-07-20.

基金项目: 上海市重点学科建设项目 (Y1101).

作者简介: 陆宏达 (1960-), 男, 教授, 主要从事水产动物病害及相关研究. Tel: 021-65710526; E-mail: hdlu@shfu.edu.cn

0.001 75%、0.002 00% 的 5 mL 混合液,以无苋菜红的 0.5 mL 抗凝血淋巴和 4.5 mL 生理盐水混合液为空白对照,在 530 nm 波长下,分别测定 OD 值,求出苋菜红与 OD 值的关系标准曲线和回归方程。

1.2.2 中华绒螯蟹循环血体积与体质量的关系标准曲线和回归方程 用生理盐水配成质量分数为 1.0% 的苋菜红 0.1 mL 注射蟹后,每隔 1 min 对蟹进行解剖,观察苋菜红均匀分布到蟹全身循环血淋巴中的时间,5 min 时苋菜红已均匀分散到蟹的全身,作为对细菌清除试验中开始采血的时间依据。

取体质量为 38.4~74.8 g 的蟹 15 只,每只注射 1.0% 苋菜红 0.1 mL,并于 5 min 时按抗凝剂与血淋巴体积比 2:5 分别采血,分别取 0.5 mL 抗凝血淋巴与 4.5 mL 生理盐水混合稀释后,在 530 nm 波长下,测定 OD 值。根据苋菜红与 OD 值的回归方程和稀释倍数,求出在蟹循环血淋巴中均匀分布后的苋菜红质量分数,再计算出每只蟹相应的循环血体积,最后求出蟹循环血体积与体质量的关系标准曲线和回归方程。

苋菜红质量分数 $C = [\text{注射苋菜红质量} / (\text{循环血体积} + 0.1 \text{ mL})] \times \text{稀释倍数}$
 $\text{循环血体积 (mL)} = 1 / (140C) - 0.1$

1.3 中华绒螯蟹对体内细菌的清除实验

将蜡状芽孢杆菌和大肠杆菌分别接种在营养琼脂培养基上,30 °C 培养 24 h,无菌生理盐水洗下后,用麦氏比浊法,配成浓度约为 $10^9/\text{mL}$ 的菌悬液,用无菌生理盐水梯度稀释后,分别取 50 μL 在营养琼脂平板上平行涂布 3 个平板,30 °C 恒温培养 24 h 后,精确计数菌落形成单位 (Clone forming unit, CFU),最后确定试验菌的精确浓度。蜡状芽孢杆菌终浓度为 $(172.8 \pm 23.7) \times 10^7/\text{mL}$,大肠杆菌终浓度为 $(168.4 \pm 22.1) \times 10^7/\text{mL}$ 。

选择规格相对一致、体质量为 $(50.03 \pm 2.09) \text{ g}$ 的蟹 30 只,其中 10 只蟹分别注射 0.1 mL 浓度为 $(172.8 \pm 23.7) \times 10^7/\text{mL}$ 的蜡状芽孢杆菌,作为实验组 I;另 10 只蟹分别注射 0.1 mL 浓度为 $(168.4 \pm 22.1) \times 10^7/\text{mL}$ 大肠杆菌,作为实验组 II;剩余的 10 只蟹分别注射 0.1 mL 无菌生理盐水,作为对照组。各组分别在水族箱中饲养,并在 10 min、30 min、60 min、120 min 时,按抗凝剂与血淋巴体积比 2:5 分别抽取 5 只蟹的血淋巴 0.25 mL,用无菌生理盐水稀释 10^3 后,取 50 μL 平行涂布 3 个平板,在 30 °C 恒温培养 24 h 后,

计数菌落形成单位 (CFU),计算出每只蟹 1 mL 血淋巴中试验菌的数量,根据蟹循环血体积与体质量关系的回归方程计算出每只蟹循环血体积中的细菌总数。最后用统计学方法计算出各取血时间点细菌平均数以及细菌清除率 (Clearance Rate, CR),某时刻的 $\text{CR} = [(\text{起始时循环血淋巴中的细菌总数} - \text{某时刻循环血淋巴中的细菌存活总数}) / \text{起始时循环血淋巴中的细菌总数}] \times 100\%$ 。各组剩余的 5 只蟹分别用于各取血时间点组织切片显微观察的组织取材。

1.4 细菌清除的组织切片观察

各组在注射菌悬液后 10 min、30 min、60 min、120 min 各时间点取血的同时,分别取蟹 1~2 只,迅速采集鳃、心脏和肝胰腺组织于 10% 福尔马林固定液中固定,常规石蜡切片,切片经二甲苯脱蜡后,用革兰氏阳性细菌 Brown-Hopps 染色法 (BH) 进行染色^[12],在 Olympus 显微镜下观察拍照。

1.5 数据统计与分析

t 检验及回归分析均采用统计软件 SPSS 13.0 for windows 进行,数据以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{X} \pm \text{SD}$) 表示, $P < 0.05$ 表示显著性差异, $P < 0.01$ 表示极显著性差异, $P > 0.05$ 表示无显著性差异。

2 结果与分析

2.1 苋菜红与 OD 值的关系标准曲线和回归方程

苋菜红质量分数 (C) 与 OD 值 (X) 关系的标准曲线如图 1 所示,求得回归曲线方程 $C = 0.004 3X + 0.000 05$ ($R_s = 0.99$, $P < 0.01$),苋菜红质量分数与 OD 值存在正相关关系。

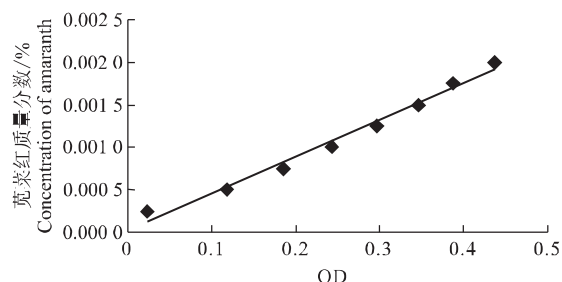


图 1 苋菜红质量分数和 OD 值关系的回归曲线

Fig.1 Relation regression line of amaranth concentration and OD value

2.2 蟹循环血体积与体质量的关系标准曲线和回归方程

根据 2.1 所得方程求得每只蟹循环血淋巴

中的苋菜红质量分数,从循环血体积 $V(\text{mL})=(1/140C)-0.1$ 的公式中计算出相应蟹的循环血体积,15 只蟹的循环血体积在 4.05~13.56 mL 之间(表 1)。蟹的循环血体积 (V) 与蟹体质量 (W) 关系的标准曲线如图 2 所示,经回归分析,回归曲线方程 $V=0.1576W-0.898$ ($R_s=0.83, P<0.01$),蟹循环血体积与蟹体质量间存在正相关关系,循环血体积与体质量的比值 (V/W) 为 $(14.86\pm2.95)\%$ 。

表 1 苋菜红染料稀释法测定中华绒螯蟹循环血体积结果
Tab.1 Determination of circulating haemolymph volume in *E.sinensis* by amaranth dying method

蟹体质量 /g Body weight	OD	苋菜红质量分数 % Concentration of amaranth	蟹循环血体积 /mL Crab haemolymph volume
38.4	0.241	0.001086	6.48
39.3	0.239	0.001078	6.53
39.4	0.298	0.001331	5.26
40.2	0.250	0.001125	6.25
40.9	0.389	0.001723	4.05
42.1	0.291	0.001301	5.39
47.4	0.301	0.001344	5.21
47.8	0.254	0.001142	6.15
53.4	0.236	0.001065	6.61
60.2	0.166	0.000764	9.25
65.6	0.188	0.000858	8.22
67.3	0.192	0.000876	8.06
68.1	0.110	0.000523	13.56
70.9	0.142	0.000661	10.71
74.8	0.150	0.000695	10.18

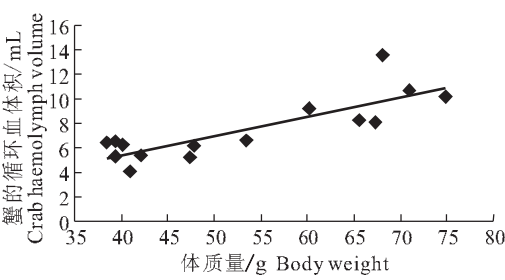


图 2 蟹循环血体积与体质量关系的回归曲线
Fig.2 Relation regression line of circulating haemolymph volume and body weight in *Eriocheir sinensis*

2.3 中华绒螯蟹对细菌的清除作用

通过回归方程 $V=0.1576W-0.898$, 体质量为 $(50.03\pm2.09)\text{g}$ 的 30 只实验蟹的平均循环血体积为 $(7.06\pm0.33)\text{mL}$ 。蜡状芽孢杆菌和大肠杆菌注射蟹体后蟹循环血淋巴中细菌数量及清除率随时

间变化见表 2 和图 3,实验组 I 和实验组 II 的蟹血淋巴中培养出的细菌菌落各自特征完全一致,无杂菌出现。注射无菌生理盐水的对照组蟹血淋巴中未培养出细菌。

实验组 I 刚注射蜡状芽孢杆菌 (0 min) 时,蟹循环血淋巴内的细菌总数为 $(172.8\pm23.7)\times10^6$,细菌注射后 10 min,循环血淋巴内的细菌数量迅速下降到 $(92.08\pm19.77)\times10^6$,细菌清除率为 $(45.81\pm13.12)\%$,与 0 min 时的细菌数量相比,存在极显著差异 ($P<0.01$); 30 min 时细菌数量继续下降到 $(56.54\pm19.95)\times10^6$,细菌清除率为 $(66.72\pm11.78)\%$,不仅与 0 min 时的细菌数量存在极显著差异 ($P<0.01$),而且与 10 min 时的细菌数量也存在极显著差异 ($P<0.01$); 60 min 时细菌数量下降到仅为 $(19.42\pm8.42)\times10^6$,细菌清除率为 $(88.57\pm4.84)\%$,与 0 min、10 min、30 min 时的细菌数量

都存在极显著差异 ($P<0.01$); 120 min 时细菌清除率为 $(89.83\pm4.84)\%$, 细菌数量为 $(17.28\pm8.53)\times10^6$, 略低于 60 min 时细菌数量, 但无显著性差异 ($P>0.05$)。注射大肠杆菌的实验组 II 与注射蜡状芽孢杆菌实验组 I 相似, 表现出细菌数量的下降趋势, 细菌总数从刚注射大肠杆菌 (0 min) 时的 $(168.4\pm22.1)\times10^6$ 下降到 10 min 时的 $(106.9\pm24.30)\times10^6$, 存在极显著差异 ($P<0.01$), 10 min 时细菌清除率为 $(35.69\pm15.19)\%$; 30 min 时细菌

数量下降到 $(50.79\pm20.13)\times10^6$, 细菌清除率为 $(69.45\pm11.62)\%$, 同样与 0 min 及 10 min 时的细菌数量均存在极显著差异 ($P<0.01$); 60 min 时细菌总数下降到最低, 为 $(16.38\pm6.74)\times10^6$, 细菌清除率为 $(90.15\pm3.88)\%$, 与 0 min、10 min 及 30 min 时的细菌数量都存在极显著差异 ($P<0.01$); 120 min 时细菌数量为 $(16.57\pm6.67)\times10^6$, 细菌清除率为 $(90.03\pm3.85)\%$, 与 60 min 时细菌数量相似, 无显著性差异 ($P>0.05$)。

表 2 各时间点中华绒螯蟹循环血淋巴中细菌数量

Tab.2 Numbers of bacteria in *Eriocheir sinensis* circulating haemolymph at different times

$n=5; \bar{X}\pm SD; \times 10^6$

细菌 Bacterium	细菌数 Bacteria nos.				
	0 min	10 min	30 min	60 min	120 min
蜡状芽孢杆菌 <i>B.cereus</i>	172.8 ± 23.7^a	92.08 ± 19.77^b	56.54 ± 19.95^c	19.42 ± 8.42^d	17.28 ± 8.53^d
大肠杆菌 <i>E.coli</i>	168.4 ± 22.1^a	106.9 ± 24.30^b	50.79 ± 20.13^c	16.38 ± 6.74^d	16.57 ± 6.67^d

注: 同一行具有不同字母上标的数据之间差异极显著 ($P<0.01$), 相同上标的数据之间差异不显著 ($P>0.05$)。

Note: Values with different superscripts in the same line mean extremely significance ($P<0.01$); and the same superscripts mean non-significance ($P>0.05$).

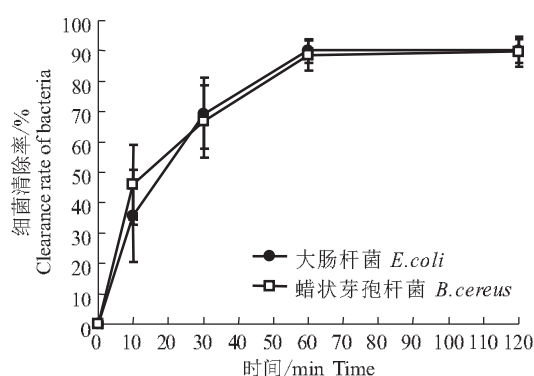


图 3 中华绒螯蟹循环血淋巴中细菌清除率随时间的变化
Fig.3 Clearance rates of bacteria with the lapse of time in *Eriocheir sinensis* circulating haemolymph

2.3 组织切片观察

注射生理盐水的对照组中华绒螯蟹的鳃叶 (图版 I-1)、心脏和肝胰腺与正常中华绒螯蟹的鳃叶、心脏和肝胰腺组织一致 [3, 13-14], 未见异常。中华绒螯蟹的正常鳃是由鳃轴和向两侧发出相互平行的鳃叶构成, 鳃叶壁是由单层扁平上皮细胞以及由其分泌的极薄一层角质膜组成, 由上皮细胞特化而成

锥体形柱细胞使鳃叶两侧壁相连, 上皮细胞和柱细胞共同形成许多成网状的小血窦, 血窦内有游离的血细胞。正常心脏略呈三角形, 有心孔和瓣膜, 心肌纤维有横纹且分支, 彼此相连成网; 正常肝胰腺由无数肝胰腺管紧密相连而成, 每一肝胰腺管都是由位于基膜上的单层柱状上皮细胞构成。

在注射蜡状芽孢杆菌菌悬液后 10 min、30 min、60 min 和 120 min 的各时间点, 除鳃组织内和心脏内血细胞形成血细胞团等变化外, 肝胰腺组织在 120 min 内无血细胞团形成等变化。注射菌后 10 min 时, 蟹的鳃轴和鳃叶内血细胞数量增加, 并开始出现聚集而形成小的血细胞团, 但尚未出现明显的包裹细菌现象 (图版 I-2), 心脏心腔内也出现由几个血细胞聚集的小团, 未出现包裹细菌现象; 注射菌后 30 min 时, 鳃叶内聚集的血细胞数量明显增加, 从外围向血细胞团聚集, 形成大小不等的血细胞团明显增多, 团内血细胞呈同心圆排列 (图版 I-3), 并表现出血细胞包裹细菌 (图版 I-4) 以及吞噬细菌的作用 (图版 I-5), 心脏心腔内同样出现血细胞聚集 (图版 I-6) 和包裹细菌现象 (图版

II -1); 注射菌后 60 min 时, 鳃叶内由几个血细胞组成小血细胞团到由几十个血细胞组成大细胞团的数量进一步增多 (图版 II -2), 鳃叶内不同大小的血细胞团包裹着数量不等的细菌, 较大的血细胞团包裹着较多的细菌 (图版 II -3); 注射后 120 min 时, 鳃叶中血细胞团内出现血细胞坏死崩解 (图版 II -4), 鳃叶内坏死崩解的血细胞和细菌形成一片无结构的残留物质 (图版 II -5), 鳃叶壁的单层扁平上皮细胞层破损 (图版 II -6)。注射大肠杆菌的组织变化表现出与注射蜡状芽孢杆菌相似的组织变化。

3 讨论

中华绒螯蟹循环系统同昆虫和其他甲壳类一样是开放式的, 血淋巴作为循环液担负着许多生理功能。循环血体积一般与生物体的体质量成正比例关系, 但不同种类动物间存在较大的差异, 掌握中华绒螯蟹循环血体积与体质量间的关系, 对开展中华绒螯蟹清除细菌等免疫功能以及与血淋巴相关的其他研究工作具有重要意义。在昆虫和其他甲壳类上, 循环血体积与体质量间关系的测定一般采用 3 种方法, 即排空法、颜料稀释法和同位素稀释法^[15-19]。排空法无需特殊的仪器设备, 但其结果往往偏低; 而同位素稀释法灵敏精确, 但需要昂贵的特殊设备; 颜料稀释法既简便又相对较为精确, 因此本实验采用颜料稀释法确定蟹循环血体积与体质量间的关系。在体质量 38.4~74.8 g 范围内的蟹循环血体积与体质量的回归曲线方程为 $V=0.1576W-0.898$, 存在着显著的相关性 ($R_s=0.83$, $P<0.01$), 循环血体积与体质量的百分比 (V/W) 为 $(14.86\pm2.95)\%$, 与其他水生甲壳类相比, 低于蓝蟹 (*Callinectes sapidus*) 循环血体积为体质量的 25.5%^[17] 和淡水螯虾 (*Cambarus virilis*) 的 25.6%^[20], 高于三叶真蟹 (*Carcinus maenas*) 的 11.39%^[16] 和 螯 虾 (*Austropotamobius pallipes*) 的 11.96%^[19]。在虾蟹类中, 中华绒螯蟹循环血体积与体质量的百分比相对偏低。

无论是实验组 I 注射的蜡状芽孢杆菌还是实验组 II 注射的大肠杆菌, 中华绒螯蟹都能够迅速清除这些进入体内的细菌, 在 60 min 内细菌数量都呈迅速下降趋势, 蜡状芽孢杆菌从 0 min 时的 $(172.8\pm23.7)\times10^6$ 下降到 10 min 时的 $(92.08\pm19.77)\times10^6$ 、30 min 时的 $(56.54\pm19.95)\times10^6$ 和 60 min

时的 $(19.42\pm8.42)\times10^6$, 大肠杆菌从 0 min 时的 $(168.4\pm22.1)\times10^6$ 下降到 10 min 时的 $(106.9\pm24.30)\times10^6$ 、30 min 时的 $(50.79\pm20.13)\times10^6$ 和 60 min 时的 $(16.38\pm6.74)\times10^6$ 。对两种细菌清除率分别从 10 min 时的 45.81% 和 35.69% 迅速上升到 30 min 时的 66.72% 和 69.45%, 进一步上升到 60 min 时的 88.57% 和 90.15%, 60 min 时的细菌数量分别与 0 min、10 min 和 30 min 时的细菌数量相比都存在极显著差异 ($P<0.01$), 在 120 min 时两种细菌数量与 60 min 时的细菌数量相比都无显著性差异 ($P>0.05$)。以上结果表明中华绒螯蟹对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都有较强的清除作用, 可在短时间内调动机体免疫防御系统, 迅速产生对细菌的清除能力, 降低细菌数量, 维持机体正常的生理机能。对细菌的清除作用在其他水生甲壳类中也有报道, 三叶真蟹的循环血内注射与本实验相同数量级的 *B.cereus* 和 *Moraxella* sp. 后, 5 min 时细菌清除率分别达到 72.61% 和 77.05%, 30 min 时细菌清除率分别达到 97.52% 和 97.86%^[16], 表现出对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌具有相同的清除能力。三叶真蟹对 *B.cereus* 的清除速度和清除率高于本实验中中华绒螯蟹对 *B.cereus* 的清除速度和清除率, 显示不同的水生甲壳类其免疫防御机能存在着差异, 使得它们对同种细菌的清除能力出现较大的差别。

中华绒螯蟹注射细菌后 10 min 时, 鳃中的血细胞开始聚集, 形成小的血细胞团; 注射后 30 min 时, 鳃中形成大小不等的血细胞团明显增多, 有明显的包裹细菌和吞噬细菌现象, 而心脏中也出现血细胞聚集现象; 注射后 60 min 时, 不同大小的血细胞团包裹着数量不等的细菌, 血细胞出现较多的吞噬细菌现象; 注射后 120 min 时血细胞团中心出现崩解的细菌和坏死细胞混合残留物质, 中华绒螯蟹通过血细胞的聚集, 对细菌进行包裹和吞噬使细菌得到清除, 表明中华绒螯蟹血细胞在体内具有的聚集、包裹和吞噬作用的非特异性免疫功能。

目前对于血细胞团形成的机理尚不完全清楚。据报道, 甲壳类动物的血细胞在未受到感染等刺激的情况下, 大多数免疫因子如抗菌蛋白、酚氧化酶和血凝成分等在血细胞内通常处于非活性状态, 受到感染等刺激后通过调节血细胞内物质的释放, 使这些免疫因子激活, 从而影响着血细胞团的形成和包裹的作用^[21-22]。Smith 等^[23]认为, 注射细菌

后三叶真蟹血细胞团形成可能是由于血细胞和细菌借助通过心脏泵血而产生的循环血液的压力,通过毛细血管流到鳃部,增加了血细胞和细菌相互接触的机会后,使得血细胞有条件相互聚集形成细胞团被动地来包裹细菌以达到清除细菌的目的。本实验中华绒螯蟹不仅在鳃叶中形成血细胞团,而且在心腔中也形成血细胞团。心腔中血细胞团不会由于心脏泵血产生的血压而被动地形成,因此血细胞团的形成,并且血细胞不断地从外围向血细胞团聚集而形成更大的血细胞团以及对细菌的包裹和吞噬作用是中华绒螯蟹血细胞主动作用的结果,脊椎动物的白细胞具有趋化性,无脊椎的软体动物错纹蛤仔 (*Tapes decussatus*) 和长毛对虾 (*Penaeus penicillatus*) 的血细胞对细菌在体外也有趋化性^[24-25],中华绒螯蟹血细胞在体内对细菌的主动聚集、包裹和吞噬作用,同样表明中华绒螯蟹血细胞对细菌具有趋化性。

在注射细菌后 10 min 时,尽管此时对蜡状芽孢杆菌和大肠杆菌的清除率分别已达到 45.81% 和 35.69%,但在鳃中尚未出现明显的血细胞对细菌包裹和吞噬现象,此时细菌数量的下降可能是通过中华绒螯蟹非特异性免疫的其他途径,如酚氧化酶系统、溶菌酶或其他抗菌活性物质等体液因子的方式加以清除或在其他如造血组织中被清除,这有待于进一步的证实。节肢动物受到寄生虫等病原生物侵入时,激活的酚氧化酶产生醌和黑色素,使侵入生物受到包被和黑化^[22]。本实验在注射细菌后 120 min 内未发现黑化现象,在注射细菌 120 min 后是否具有黑化作用也有待于进一步的证实。

中华绒螯蟹鳃是呼吸器官,水流通过鳃叶进行气体交换,鳃叶最外面是由一层极薄的角质层和一层上皮细胞组成,上皮细胞与柱状上皮细胞形成鳃腔,构成小血窦,血窦与外界水体只有一层上皮细胞的这样结构,极易受到水流中病原生物尤其病原细菌的侵入、感染和破损作用,鳃组织中血细胞团的形成、血细胞的包裹和吞噬作用构成了中华绒螯蟹抗感染的重要防线。

参考文献:

- [1] 马贵华,钟青,刘六英,等. 中华绒螯蟹传染性疾病的研究进展[J]. 内陆水产,2006,31(11): 16-18.
- [2] 徐海圣,舒妙安,占秀安,等. 养殖河蟹弧菌病原菌分离鉴定及其胞外产物的致病性[J]. 水产学报,2002,26(4): 357-362.
- [3] 陆宏达,范丽萍,薛美. 中华绒螯蟹小核糖核酸病毒病及其组织病理学[J]. 水产学报,1999,23(1): 61-68.
- [4] 陆宏达,刘凯,张明辉. 中华绒螯蟹血淋巴中酚氧化酶的部分生化特性[J]. 上海水产大学学报,2007,16(3): 236-241.
- [5] 沈锦玉,刘问,曹铮,等. 免疫增强剂对中华绒螯蟹免疫功能的影响[J]. 浙江农业学报,2004,16(1): 25-29.
- [6] 马贵华,钟青,曹义虎,等. 中华绒螯蟹免疫因子一溶菌酶的初步研究[J]. 淡水渔业,2006,36(1): 25-27.
- [7] 陆宏达,刘凯. 中华绒螯蟹血淋巴抗菌活性的初步研究[J]. 海洋渔业,2006,28(4): 285-291.
- [8] 陆宏达,张明辉. 中华绒螯蟹血清凝集素的凝集活性及其部分理化性质[J]. 水产学报,2004,28(增刊): 151-156.
- [9] 宋林生,季延宾,蔡中华,等. 温度聚升对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 几种免疫化学指标的影响[J]. 海洋与湖沼,2004,35(1): 74-77.
- [10] Yeager J F, Munson S C. Blood volume of the roach, *Periplaneta americana*; determined by several methods[J]. Arthropoda, 1950, 1: 255-265.
- [11] 张明辉,陆宏达. 中华绒螯蟹血淋巴抗凝剂的筛选[J]. 水产科技情报,2005; 32(6): 93-98.
- [12] Portaels F, Johnson P, Meyers W M. Diagnosis of Mycobacterium ulcerans disease (Buruli Ulcer) [M]. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2001: 92.
- [13] 顾志峰,王文,杜开和,等. 中华绒螯蟹鳃的组织及超微结构[J]. 湖泊科学,2000,12(2): 182-185.
- [14] 方敏,金卫中,宋林生,等. 中华绒螯蟹颤抖病组织病理学研究[J]. 海洋与湖沼,2003,34(3): 322-328.
- [15] 龚和,张建中. 昆虫血淋巴和血淋巴体积的测定方法[J]. 昆虫知识,1982,2: 36-38.
- [16] Smith V J, Ratcliffe N A. Host defence reactions of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.): clearance and distribution of injected test particles[J]. J Mar Biol Assoc UK, 1980; 60: 89-102.
- [17] Gleeson R A, Zubkoff P L. The determination of haemolymph volume in the blue crab, *Callinectes sapidus*, utilizing ¹⁴C-thiocyanate[J]. Comp Biochem Physiol, 1977, 56A: 411-413.
- [18] Harris R R, Andrews M B. Extracellular fluid volume changes in *Carcinus maenas* during acclimation to low and high environmental salinities[J]. J Exp Biol, 1982, 99: 161-173.
- [19] Rhodes C P. The relationship between size and blood volume in the crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet) (De-

- capoda; Astacidea) [J]. Crustaceana, 1982; 43 (1): 51–59.
- [20] Prosser C L, Weinstein S J. Comparison of blood volume in animals with open and with closed circulatory systems[J]. Physiol Zool, 1950, 23: 113–124.
- [21] Smith V J, Brown J H, Hauton C. Immunostimulation in crustacean: does it really protect against infection? [J]. Fish Shellfish Immunol, 2003, 15: 71–79.
- [22] Söderhäll K. Prophenoloxidase activating system and melanization – a recognition mechanism of Arthropods? A review [J]. Dev Comp Immunol; 1984, 6, 601–611.
- [23] Smith V J, Ratcliffe N A. Cellular defence reactions of the shore crab, *Carcinus maenas*: in vivo hemocytic and histopathological responses to injected bacteria [J]. J Invertebr Pathol, 1980, 35: 65–74.
- [24] Yip E C H, Wong Y H, Wong J T Y. Bacterial formyl peptide mediated chemotaxis and extracellular acidification in shrimp haemocytes [J]. Dev Comp Immunol, 2001, 25: 269–277.
- [25] Lopez-Cortes L, Castro D, Navas J I, et al. Phagocytic and chemotactic responses of manila and carpet shell clam haemocytes against *Vibrio tapetis*, the causative agent of brown ring disease [J]. Fish Shellfish Immunol, 1999, 9: 543–555.
- [23] Smith V J, Ratcliffe N A. Cellular defence reactions of the

Clearance activities of injected bacteria in *Eriocheir sinensis*

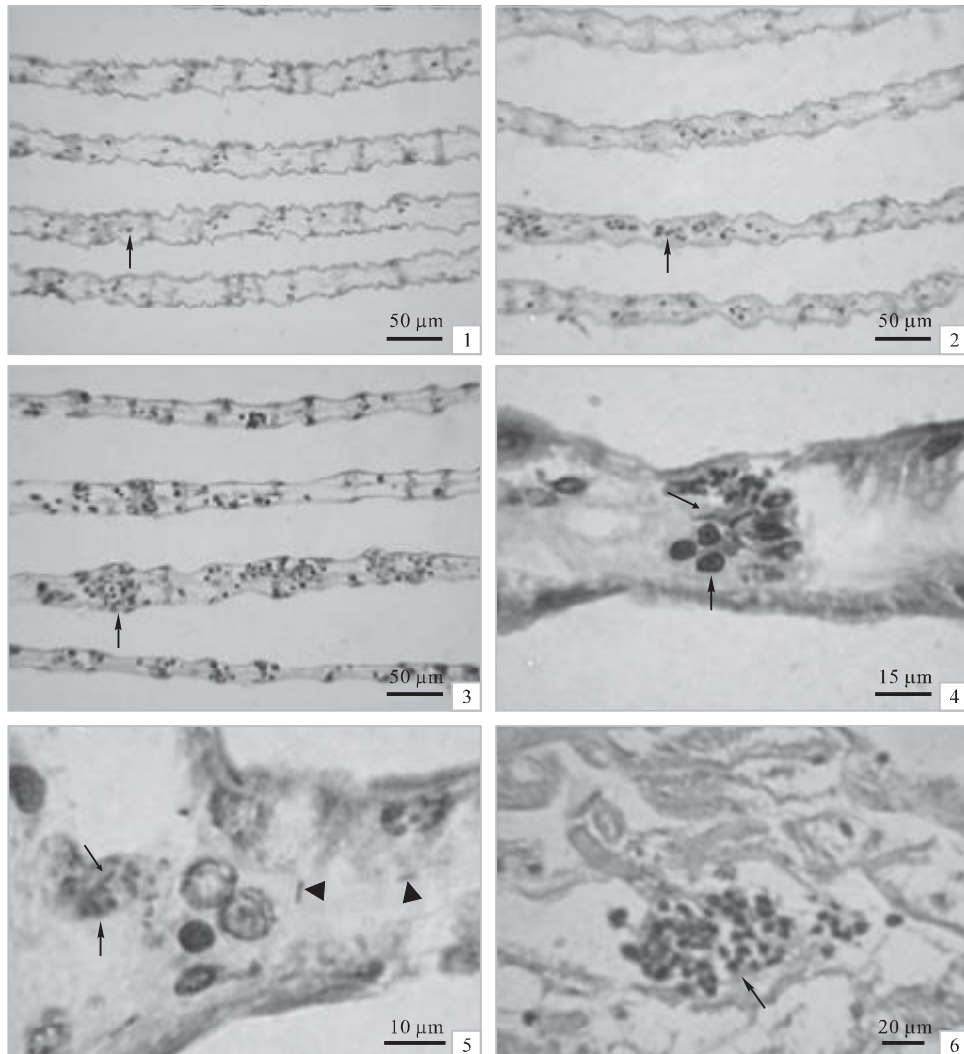
LU Hong-da, LIU Kai

(College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: *Eriocheir sinensis* is one of the main aquaculture species extensively cultured in China. It was reported that there were several immune factors in *E. sinensis* individually studied in vitro. Actually, the immune defense response to outside organisms, including bacteria clearance, is the cooperating result of all defense factors in vivo. In this study, the experiments were carried out by injecting different bacterium into the crab bodies, and the relationship of circulating haemolymph volume (V) and body weight (W) in crab bodies was determined. The regression equation was $V = 0.1576W - 0.898$ ($R_s = 0.83$, $P < 0.01$) by the dye method of amaranth. The percentage of V/W in *E. sinensis* was $(14.86 \pm 2.95)\%$ which was relatively low compared with that in other crab or shrimp species. On the basis of this circulating haemolymph volume in *E. sinensis*, the clearance rates with the lapse of time and the clearance ways on injected *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* in *E. sinensis* were studied by histological observation. The results showed that the clearance rates of *B. cereus* and *E. coli* by *E. sinensis* were $(45.81 \pm 13.12)\%$ and $(35.69 \pm 15.19)\%$ respectively 10 min after the bacteria injection, and reached the highest percentages 60 min after injection, which were $(88.57 \pm 4.84)\%$ and $(90.15 \pm 3.88)\%$ respectively, and the clearance rates of bacteria at 120 min were not significantly different compared with those at 60 min after the injection ($P > 0.05$). However, the clearance rates of *B. cereus* with the lapse of time in *E. sinensis* were lower than that in *C. maenas*. The differences of clearance rates between the same bacterium illustrated that the immune defense capabilities in different species of crabs were different. Meanwhile, haemocytes in gill started to form clumps at 10 min after the injection of bacteria, and had the abilities of encapsulation and phagocytosis of bacteria at 30 min, and were necrotic with broken bacteria at 120 min, all of which illustrated *E. sinensis* had non-specific immune functions such as forming clumps, encapsulation and phagocytosis. Non-specific immune functions are important ways of bacteria clearance in *E. sinensis*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (1): 113–121]

Key words: *Eriocheir sinensis*; bacterium clearance rate; encapsulation; phagocytosis

Corresponding author: LU Hong-da. Tel: 86–21–65710526; E-mail: hdlu@shfu.edu.cn

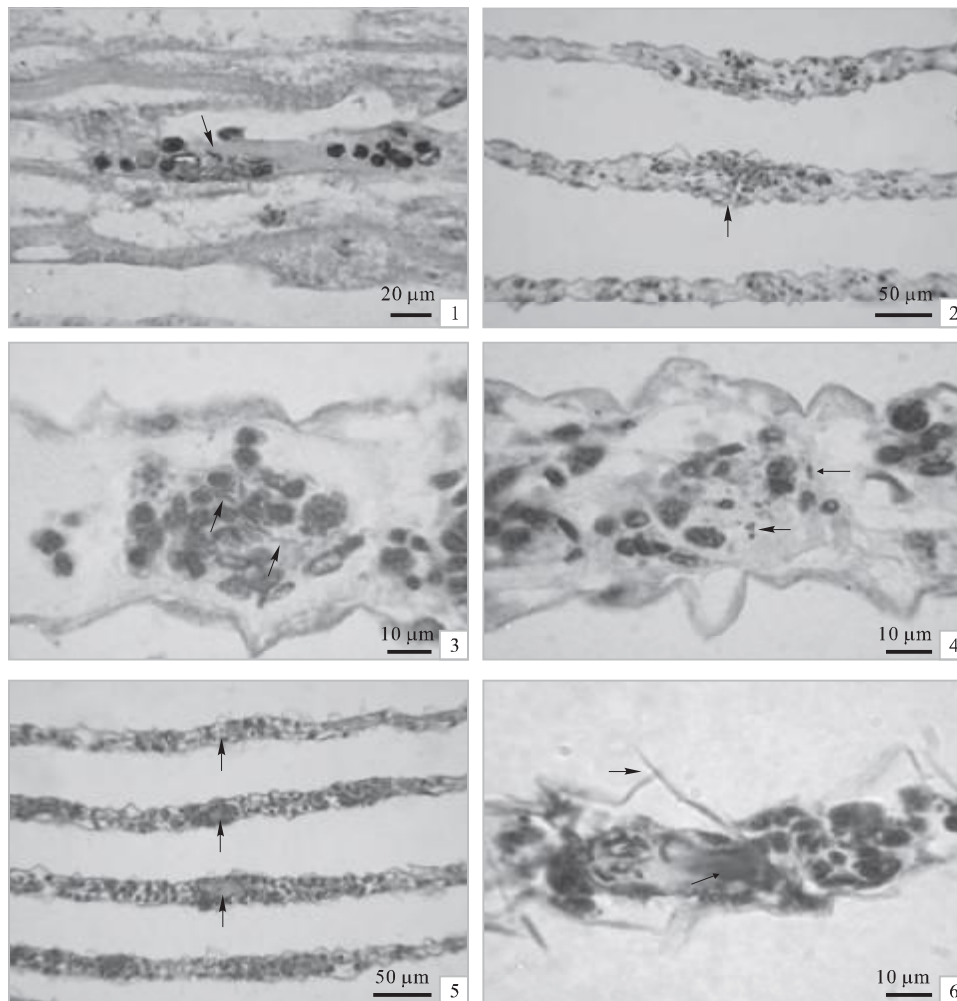


图版 I

1. 对照组中华绒螯蟹的鳃叶组织结构, 血窦内分布着血细胞 (↑); 2. 注射菌后 10 min, 鳃叶内血细胞开始聚集, 并有小血细胞团的形成 (↑); 3. 注射菌后 30 min, 鳃叶内血细胞团数量增加, 血细胞团增大 (↑); 4. 注射菌后 30 min, 示鳃叶血窦内的血细胞团 (↑) 及团内的细菌 (↑); 5. 注射菌后 30 min, 示鳃叶内吞噬的血细胞 (↑)、被吞噬的细菌 (↑) 和散布在血窦内未被吞噬的细菌 (▶); 6. 注射菌后 30 min, 心腔内出现的血细胞团 (↑)。

Plate I

1, Histological structure of secondary gill lamellae of *Eriocheir sinensis* after injection of sterile saline in control group. Haemocytes (↑) in the sinuses of secondary gill lamellae. 2, 10 min after injection of bacterian, haemocytes gather and form small haemocyte clump (↑) in the sinuses of secondary gill lamellae. 3, 30 min after injection of bacteria, numbers and sizes of haemocyte clumps increase (↑) in the sinuses of secondary gill lamellae. 4, 30 min after injection of bacteria, noting haemocyte clump (↑) and bacteria (↑) within the haemocyte clump in the sinus of secondary gill lamellae. 5, 30 min after injection of bacteria, phagocytic cell (↑), phagocytosed bacterium (↑) and non phagocytosed bacterium (▶) in the sinuses of secondary gill lamellae. 6, 30 min after injection of bacteria, haemocyte clump (↑) appears in the heart.



图版 II

1. 注射菌后 30 min, 心腔内的血细胞团及团内的细菌 (↑); 2. 注射菌后 60 min, 鳃叶内血细胞团进一步增大, 鳃血窦扩大, 鳃叶增粗 (↑); 3. 注射菌后 60 min, 示鳃叶血窦内的大血细胞团及团内的许多细菌 (↑); 4. 注射菌后 120 min, 鳃叶内血细胞团中的细菌 (↑) 和血细胞崩解碎片 (↑); 5. 注射菌后 120 min, 鳃叶内的血细胞团中心出现血细胞与细菌坏死崩解后的无结构物质 (↑); 6. 注射菌后 120 min, 鳃叶内的血细胞团中心出现血细胞与细菌坏死崩解后的无结构物质 (↑) 和鳃叶壁的单层扁平上皮细胞层破损 (↑).

Plate II

1, 30 min after injection of bacteria, bacterium (↑) within the haemocyte clump in the heart. 2, 60 min after injection of bacteria. sinuses and gill lamellae (↑) expand due to enlarging the haemocyte clump. 3, 60 min after injection of bacteria. noting big haemocyte clump and many bacteria (↑) within the haemocyte clump in the sinus of secondary gill lamellae. 4, 120 min after injection of bacteria, bacterium (↑) and necrotic haemocytes (↑) within haemocyte clump in the sinus of secondary gill lamellae. 5, 120 min after injection of bacteria, no structure substances (↑) in the centre of haemocyte clump in the sinuses of secondary gill lamellae after haemocytes and bacteria necrosis. 6, 120 min after injection of bacteria. no structure substances (↑) appear in the centre of haemocyte clump and rupture of epithelium in the wall of secondary gill lamellae (↑).